

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO99/47155 (43) 国際公開日 1999年9月23日(23.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01373		(81) 指定国 AU, CA, KR, NZ, US, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
(22) 国際出願日 1999年3月19日(19.03.99)		添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平10/70914 1998年3月19日(19.03.98) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 谷 徹(TANI, Tohru)[JP/JP] 〒525-0055 滋賀県草津市野路町桜ヶ丘4-3-6 Shiga, (JP) 近藤浩之(KONDO, Hiroyuki)[JP/JP] 〒520-2143 滋賀県大津市萱野浦22-46-607 Shiga, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)		

(54)Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR SEPSIS

(54)発明の名称 敗血症予防及び／又は治療剤

(57) Abstract

Novel preventives and/or remedies for sepsis. The above preventives and/or remedies contain as the active ingredient tumor cytotoxic factor-II (TCF-II) and exert particularly excellent effects on sepsis caused by at least one factor selected from the group consisting of infectious disease, burn, operation, cancer, acquired immunological deficiency syndrome (AIDS), radiation therapy, chemotherapy and total parenteral nutrition (TPN).

新規な敗血症の予防及び／又は治療剤を提供する。

腫瘍細胞障害因子(Tumor Cytotoxic Factor-II : T C F - II) を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤。特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群 (A I D S) 、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養 (T P N) からなる群から選択される少なくとも 1 種の要因に基づき発症した敗血症に対して優れた効果を奏する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	共和国	TR トルコ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	NE ニジエール	VN ヴィエトナム
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	YU ユーゴースラビア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	
CZ チェコ	KG ケルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国	RU ロシア	

明細書

敗血症予防及び／又は治療剤

技術分野

本発明は、腫瘍細胞障害因子 (Tumor Cytotoxic Factor-II ; TCF-II) を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤に関する。本発明により、感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養 (TPN) からなる群から選択される 1 以上の要因に基づき発症した敗血症に対する優れた予防及び／又は治療剤が提供され、医薬として有用である。

従来技術

一般に敗血症は、体の組織あるいは臓器のどこかに細菌感染巣があり、その病巣から絶えずあるいは断続的に、細菌あるいはその産物が流血中に侵入して発症する重症全身性感染症である。敗血症は、例えば悪性腫瘍、白血病、悪性リンパ腫、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 、膠原病、腎不全、肝疾患、脳血管障害、糖尿病などの基礎疾患を持った患者、高齢者、未熟児といった液性免疫不全、細胞性免疫不全を含めた抵抗力の減弱した宿主が副腎ステロイドや抗腫瘍剤といった化学療法、コバルト照射といった放射線治療、または留置カテーテル、血液透析、臓器移植、心臓手術などの処置、手術を行った場合にそれらが誘因となり発症する。近年、各種有力な抗生物質が開発され、敗血症に対する治療が行われてはいるものの、ペニシリンあるいはメチシリン耐性黄色ブドウ状球菌といった各種抗生物質耐性菌の出現を招き、依然として敗血症全体の致命率は約25%で、かなりの患者が敗血症のために毎年死亡している。

敗血症の原因菌としては、上記各種抗生物質耐性菌以外にも腸レンサ状球菌、グラム陰性桿菌である大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、プロテウスなどが主なものとして挙げられている。このうちグラム陰性桿菌による敗血症では、初期には

高熱、悪寒戦慄、頻脈、血圧軽度低下、末梢抵抗低下、心拍出量増加、過換気と呼吸アルカローシス、高乳酸血症などの症状を呈し、心不全に至ることもある。その後、血圧と心拍出量が低下し、代謝性アシドーシス、意識障害、四肢冷感、低血糖などを呈して重篤な状態に陥り、死に至ることもあり、これら敗血症に対する治療の重要性が唱えられている。

一方、細菌の生体内への侵入経路には大きく分けて2つ考えられている。輸液や補液のための静脈内留置カテーテルや穿刺針といったものが感染門戸となる外因性の場合と、腸管を始めとするヒトの身体に広く分布する常在菌が腸管等より侵入する内因性の場合がある。この腸管からの細菌あるいは細菌産生物の移行をバクテリアルトランスロケーションまたはエンドトキシントランスロケーションと呼び、敗血症に至る引き金として注目されている。このような腸管からの細菌や細菌産生物の移行は、熱傷や大手術等の高度侵襲時あるいは手術後患者や意識障害患者への長期T P N施行時に認められ、大きな問題となっている。

これらバクテリアルトランスロケーションを含めた敗血症の治療には、抗生物質が第一選択され、一定の効果は認められているものの、副作用、耐性菌の出現さらにはショック症状に対する効果といった点で、抗生物質には限界があると考えられている。また、輸液による栄養の補強やアーグロプリン製剤等による治療も行われているが宿主の免疫機能の回復を目的としたものであり、あくまでも抗生物質による治療の補助的な治療法に止まっており、効果的な治療法がないのが実状である。

発明の開示

本発明者らは、敗血症に対する治療薬物を鋭意探索した結果、腫瘍細胞障害因子として知られているT C F - IIが、敗血症に対し優れた予防及び治療効果を有することを見出した。従って本発明は、T C F - IIを有効成分とする、敗血症、特に熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群（A I D S）、放射線治療、化学療

法、長期中心静脈栄養（TPN）からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した敗血症の予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

本発明により、TCF-IIを有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤が提供される。本発明薬剤は敗血症、特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養（TPN）からなる群から選択される1以上の要因に基づき発症した敗血症に対する予防及び／又は治療剤として有用である。

本発明の有効成分であるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞由来の公知の蛋白質であり、下記の特性を有する。

i) 分子量（SDS電気泳動法）

非還元下 : 78,000±2,000 又は74,000±2,000

還元下 : 52,000±2,000 (共通バンドA)

30,000±2,000 (バンドB)

26,000±2,000 (バンドC)

ii) 等電点 : 7.4 ~ 8.6

上記TCF-IIは、ヒト線維芽細胞培養液を濃縮しイオン交換体に吸着させ、その溶出液をアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製する方法（WO 90/10651号公報）、或いは遺伝子工学的手法（WO 92/01053号公報）によって得ることができる。

本発明の有効成分であるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞IMR-90由来のものを用いることが可能であり、又、WO 90/10651号公報に記載された遺伝子配列に基づいて、微生物や他の細胞により遺伝子組換え操作により生産されたものでもよい。又、WO 92/01053号公報に開示された遺伝子工学的手

法により得られたものを用いてもよい。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能であるが、好ましくは糖鎖の結合しているものを用いる。これらの方法により得られた TCF-II は、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲルfiltration、モノクローナル抗体を用いたアフィニティーコロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティーコロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製 TCF-II は、凍結乾燥あるいは凍結保存することができる。その他、TCF-II と同様の活性を有するものであれば、本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、TCF-II 蛋白質と 5 アミノ酸の違いを有する蛋白質である肝細胞増殖因子 (HGF ; 特開昭63-22526号)、あるいは精製 Scatter Factor (SF ; Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228 (1990)) などが挙げられる。

本発明の敗血症予防及び／又は治療剤は、注射剤として静脈、筋肉内、あるいは皮下より投与することができる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ製造され、必要に応じ pH 調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤を患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人 1 日当たり精製 TCF-II として 0.6mg～600mg、好ましくは 6mg～60mg を含有する製剤を 1 日 1 回若しくはそれ以上投与すれば良い。

図面の簡単な説明

第 1 図は、実施例 1 の TCF-II の盲腸穿刺敗血症モデルに対する効果を示す。

●は溶媒投与群を、また ■ は TCF-II 投与群をそれぞれ示す。

第 2 図は、実施例 2 の TCF-II の LPS 誘導バクテリアルトランスロケーションに対する効果を示す。

□は溶媒投与群を、また■はTCF-II投与群をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

〔製造例1〕

TCF-IIの精製

WO 90/10651号公報に開示された方法、及び東尾らの方法 (Higashio, K. et al. B.B.R.C., vol.170, pp397-404 (1990))に準じて細胞を培養し、精製 TCF-IIを得た。即ち、ヒト線維芽細胞IMR-90 (ATCC CCL-186) を5%仔牛血清を含むDMEM培地100mlをいれたローラーボトルに 3×10^6 個移植し、0.5~2回転/分の回転速度で回転させながら7日間培養を続けた。総細胞数が 1×10^7 個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、5~9メッシュのセラミック100g (東芝セラミック社) を殺菌して投入し、24時間静置して培養した。その後、上記培養液を500ml加え、培養を継続した。7~10日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして2ヶ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり4Lの培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの比活性は32 μ g/mlであった。培養液750Lをメンブランフィルター (MW6000カット; アミコン社) 処理によりUF濃縮し、CMセファデックスC-50 (ファルマシア社) 、ConAセファロース (ファルマシア社) 、Monosカラム (ファルマシア社) 、ヘパリンセファロース (ファルマシア社) による4段階のクロマト精製を行い、精製TCF-IIを得た。

〔製造例2〕

遺伝子組換TCF-IIの生産

WO 92/01053号公報に開示された方法に従い、TCF-II遺伝子を組

み込んだ細胞を培養し、精製 T C F - IIを得た。形質転換ナマルワ (N a m a l w a) 細胞を培養し、培養液 2 0 Lを得た。この培養液を CM - セファデックス C - 50 クロマト (ファルマシア社)、C o n - A セファロース CL - 6 B クロマト (ファルマシア社)、M o n o S カラム (ファルマシア社) を装着した H P L C の順に処理を行い、約 1 1 m g の精製 T C F - IIを得た。

〔製造例 3〕

T C F - II 製剤の製造

製造例 1 及び 2 により得られた T C F - II の注射剤の製造例を示す。

(1) T C F - II	2 0 μ g
ヒト血清アルブミン	1 0 0 m g

上記組成を pH 6. 0 3 のクエン酸緩衝液に溶解し全量を 2 0 m l に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 m l づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(2) T C F - II	4 0 μ g
ツイーン 8 0	1 m g
ヒト血清アルブミン	1 0 0 m g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を 2 0 m l に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 m l づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(3) T C F - II	2 0 μ g
ツイーン 8 0	2 m g
ソルビトール	4 g

上記組成を pH 6. 0 3 のクエン酸緩衝液に溶解し全量を 2 0 m l に調製し、滅菌後バイアル瓶に 2 m l づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(4) T C F - II	4 0 μ g
ツイーン 8 0	1 m g
グリシン	2 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20m1に調製し、滅菌後バイアル瓶に2m1づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(5) T C F - II	4 0 μ g
ツイーン80	1 m g
ソルビトール	2 g
グリシン	1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20m1に調製し、滅菌後バイアル瓶に2m1づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(6) T C F - II	2 0 μ g
ソルビトール	4 g
ヒト血清アルブミン	5 0 m g

上記組成をpH 6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20m1に調製し、滅菌後バイアル瓶に2m1づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(7) T C F - II	4 0 μ g
グリシン	2 g
ヒト血清アルブミン	5 0 m g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20m1に調製し、滅菌後バイアル瓶に2m1づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

(8) T C F - II	4 0 μ g
ヒト血清アルブミン	5 0 m g

上記組成をpH 6.03のクエン酸緩衝液に溶解し全量を20m1に調製し、滅菌後バイアル瓶に2m1づつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

〔実施例1〕

盲腸穿刺敗血症ラットに対するT C F - II投与の効果

S D 系雄性ラット 7 週齢を用い、敗血症モデルは盲腸への 22G 注射針による

1回穿刺により作成した (J. Surgical Research 29, 189-201 (1980))。敗血症モデル作成 48 時間前に、溶媒のみを投与する対照群 (溶媒投与群) (15 匹) と TCF-II を投与する TCF-II 投与群 (11 匹) の 2 群に分け、12 時間ごとに 5 回、静脈内に溶媒あるいは TCF-II を投与した。TCF-II の投与は 1 回当たり $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。敗血症モデル作成後 2 日目までの生存率変化の結果を第 1 図に示す。この結果、2 日目における生存率は溶媒投与群と比較して、TCF-II 投与群が有意に高く、TCF-II 投与により敗血症ラットの生存率が有意に上昇した。即ち、TCF-II は敗血症発症後の生存率を著しく改善することが認められた。

〔実施例 2〕

LPS 誘導バクテリアルトランスロケーションに対する TCF-II 投与の効果

ICR 雄性マウス 7 週齢を用い、LPS を静脈内に $5 \text{mg}/\text{kg}$ 投与した。LPS 投与 30 時間前に、溶媒のみを投与する対照群 (溶媒投与群) (6 匹) と TCF-II を投与する TCF-II 投与群 (6 匹) の 2 群に分け、12 時間ごとに 3 回、静脈内に溶媒あるいは TCF-II を投与した。TCF-II の投与は 1 回当たり $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。LPS 投与 24 時間後の腸間膜リンパ節における検出細菌数の結果を第 2 図に示す。溶媒投与群と比較して、TCF-II 投与群で検出細菌数は有意に低く、TCF-II 投与により、LPS 投与によって誘導される腸管からの菌の移行が有意に抑制された。即ち、TCF-II は敗血症の引き金となるバクテリアルトランスロケーション (Berg, R.D. : J. Med 23, 217-244 (1992)) に対しての生存率を著しく改善することが認められた。

産業上の利用可能性

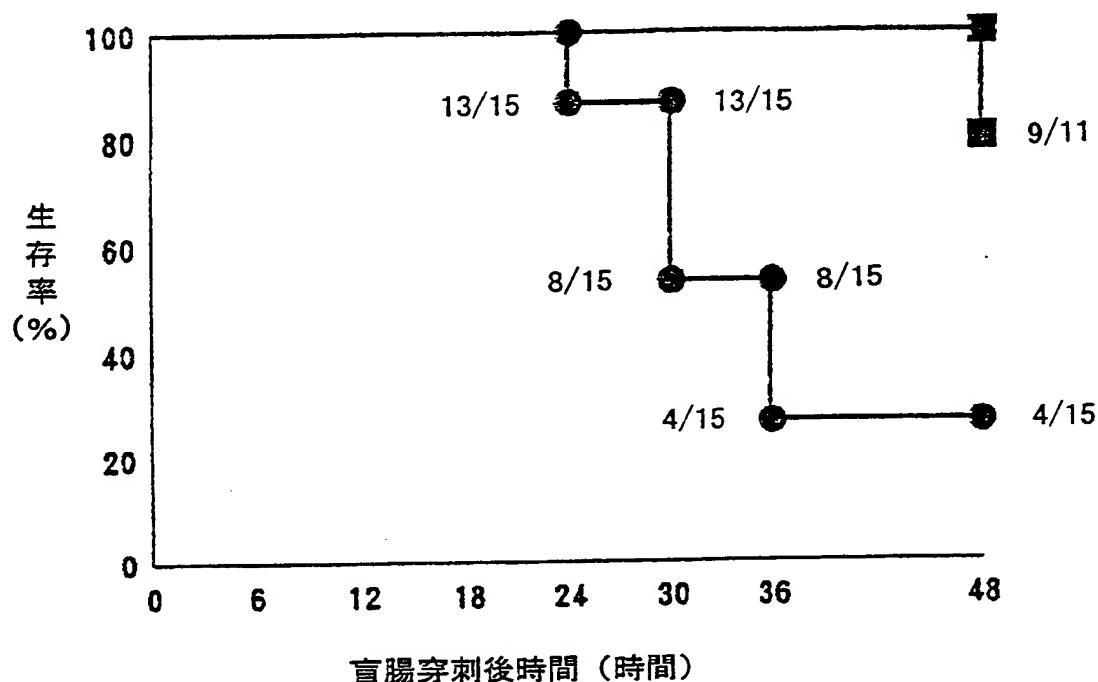
本発明により、TCF-II を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤が提供される。本発明薬剤は、敗血症、特に感染症、熱傷、手術、癌、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 、放射線治療、化学療法、長期中心静脈栄養 (TPN) か

らなる群から選択される 1 以上の要因に基づき発症した敗血症に対する予防及び
／又は治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 腫瘍細胞障害因子(Tumor Cytotoxic Factor-II ; T C F - II) を有効成分とする敗血症予防及び／又は治療剤。

第1図



第2図

